第11卷 第3期 动 物 学 研 究 Vol. 11, No. 3
1990年8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1990

竹叶青 *Trimeresurus stejnegeri* 蛇毒凝血酶样酶的酶学性质研究

刘念昆 熊郁良

（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

本文报道从竹叶青蛇毒中纯化的两个凝血酶样酶（组分Ⅰ和组分Ⅱ）的酶学性质研究。结果表明二者在体外都能使人纤维蛋白原转变为纤维蛋白，具有精氨酸酯酶活性，都能水解凝血酶专一性底物。纤维蛋白平板法证明组分Ⅰ具有激活纤溶作用；组分Ⅱ同时具有激活纤溶和直接纤溶作用；组分Ⅰ和组分Ⅱ能缓慢降解纤维蛋白原的α链，随着作用时间延长，组分Ⅰ还能进一步部分降解纤维蛋白原的β链，活性中心探讨表明，组分Ⅰ的活性中心由丝氨酸蛋白酶部位和糖基部位组成。组分Ⅰ水解BAEE的最适温度为50℃，最适pH为8.6。

关键词：凝血酶样酶，凝血酶专一性底物，酶活性中心，纤维蛋白原降解作用

1976年云南省动物研究所第四室报道了竹叶青蛇毒中含有较高的精氨酸酯酶活力，1983年杨长久等报道了竹叶青蛇毒中含有较强的凝血酶样酶活性。但竹叶青蛇毒中纯化的凝血酶样酶理化性质、酶学性质及体内外抗凝血作用等研究尚未见报道，本文对纯化的竹叶青蛇毒凝血酶样酶的酶学性质报道如下。

材 料 和 方 法

材料：竹叶青蛇毒凝血酶样酶按照前文方法纯化。腺嘌呤核苷三磷酸二钠盐(ATP)为上海生化所东风试剂厂产品，胰蛋白酶、尿激酶为上海生物化学制药厂产品，辅酶Ⅰ为上海酵母厂生产，5′-UMP为Sigma公司产品，苯甲基磺酰氟(PMSF)为E. Merck公司产品，其它试剂均为国产试剂。

方法：1.纤维蛋白原凝固时间、精氨酸酯酶活力测定、对凝血酶专一性底物Bz-Phe-Val-Arg-PNA的水解活力测定，均同前文报道。

2.出血毒活性测定：参照Omori等（1964）方法进行。

3.蛋白水解酶、5′-核苷酸酶、腺三磷酶、核苷焦磷酸酶活性测定，参照云南省动

本文1988年5月24日收到，同年12月19日修回。

物研究所第四室（1976）方法进行。

4.纤维蛋白溶解活性测定：①对纤维蛋白原链的降解作用，参照王琬瑜等（1982）方法进行。②纤维蛋白平板法，参照叶智彰等（1981）方法进行。

5.活性中心探讨：参考管利丰等（1982）方法进行。

6.最适温度和最适pH的测定：在不同温度或在不同的pH下测定精氨酸酯酶活力。

结　果

1.竹叶青凝血酶样酶组分Ⅰ和组分Ⅱ的纤维蛋白原凝固时间、精氨酸酯酶比活力和水解凝血酶专一性三肽底物（Bz-Phe-Val-Arg-PNA）活性见表1。

表1　竹叶青凝血酶样酶的酶活性测定

Tab.1. Some enzymic activity of the thrombin-like enzymes purified from the venom of *T. stejnegeri*

纤维蛋白原凝固时间	组　分　Ⅰ	组　分　Ⅱ	粗　　毒
家兔血浆 0.2ml	1′3″（20μg酶）	24″（20μg酶）	
人纤维蛋白原 0.2ml(0.4%)	1′14″(20μg酶)	46″(20μg酶)	44″(0.8mg粗毒)
精氨酸酯酶比活力（μM/min/mg）	8.71	3.86	2.70
水解凝血酶专一性三肽底物	+++	+-	

2.出血毒活性测定和其它酶活性测定。组分Ⅰ和组分Ⅱ（60μg）经测定均无粗毒中具有的出血毒活性、蛋白水解酶、5′-核苷酸酶、腺三磷酶和核苷焦磷酸酶等酶活性。

3.纤维蛋白溶解活性。①组分Ⅰ和组分Ⅱ（30μg）对纤维蛋白原链的降解作用见图1；②组分Ⅰ和组分Ⅱ的纤维蛋白平板实验见表2。

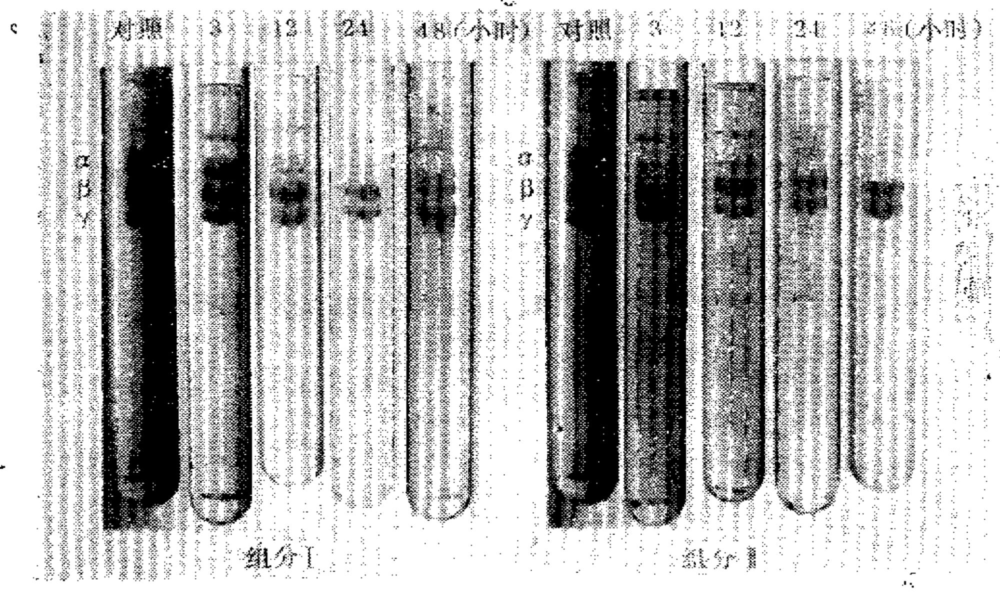


图1　人纤维蛋白原经竹叶青凝血酶样酶组分Ⅰ、组分Ⅱ降解后的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human fibrinogen degraded by the thrombin-like enzymes from *T. stejnegeri*

表2　竹叶青凝血酶样酶对人纤维蛋白的溶解作用(mm^2)

Tab.2. Degradation of the thrombin-like enzymes from *T. stejnegeri* toward human fibrin (mm^2)

样　品（10μl）	标准平板	加热平板
对　照	0	0
粗　毒(8mg/ml)	306	81
组　分 Ⅰ(3mg/ml)	144	0
组　分 Ⅱ(3mg/ml)	126	56
尿 激 酶(1000u/ml)	216	0
胰蛋白酶(1000u/ml)	400	415

表3　不同抑制剂对竹叶青凝血酶样酶组分Ⅰ的抑制作用

Tabl.3. Effect of inhibitors on activity of the thrombin-like enzyme Principle Ⅰ from *T. stejnegeri*

精氨酸酯酶活性% / 时间 / 抑制剂	30分	2.5小时	6小时
无抑制剂	100	100	100
过 碘 酸($5\times10^{-3}M$)	0	0	0
β-巯基乙醇(1%)	79	34	18
PMSF($5\times10^{-3}M$)	71	43	31

4.活性中心探讨。过碘酸、巯基乙醇和丝氨酸蛋白酶的专一性抑制剂PMSF对竹叶青凝血酶样酶组分Ⅰ都有明显的抑制作用，其中过碘酸的抑制作用较强。见表3。

5.最适温度和最适pH测定。组分Ⅰ水解BAEE的最适温度为50°C，最适pH为8.6。

6.金属离子对组分Ⅰ和组分Ⅱ酶活性的影响。我们测定了几种常见金属离子 K^+、Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Co^{2+} 对组分Ⅰ和组分Ⅱ酶活性的影响，结果表明 Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+} 对组分Ⅰ的精氨酸酯酶活性有明显抑制作用，Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Co^{2+} 对组分的Ⅱ精氨酸酯酶活性有明显抑制作用，在所测离子中未见有起激活作用者；对于纤维蛋白原凝固活性，Ca^{2+}、Co^{2+} 离子对组分Ⅰ、组分Ⅱ有明显激活作用，而Mg^{2+}离子仅对组分Ⅰ有激活作用，Fe^{3+}离子对组分Ⅰ、组分Ⅱ均有明显抑制作用。

结 果 讨 论

从竹叶青蛇毒中分离纯化的组分Ⅰ和组分Ⅱ能凝固纤维蛋白原和水解凝血酶专一性三肽底物，具有精氨酸酯酶活性，无粗毒中其它的酶活性和出血毒活性，表明它们是凝血酶样酶。纯化的组分Ⅰ和组分Ⅱ对人纤维蛋白原的凝固活性分别比粗毒提高25倍和40倍左右。

组分Ⅰ和组分Ⅱ对人纤维蛋白溶解作用明显不同。平板法表明组分Ⅰ只有激活纤溶作用（激活胞浆素原）与尿激酶作用相似，而组分Ⅱ既有激活纤溶也有直接纤溶作用，是否组分$Ⅱ_a$和组分$Ⅱ_b$各具有激活纤溶和直接纤溶作用，尚待进一步研究，这表明它们有希望用于血栓治疗；对纤维蛋白原链的降解曾有报道，红口蝮蛇毒纯化的凝血酶样酶（Ancrod）长时间作用于人纤维蛋白原能降解α链（Pizzo，1972），从东部菱斑响尾蛇毒纯化的凝血酶样酶（Crotalase）能缓慢降解人纤维蛋原白的β链（Markland，1977），从蝮蛇（*Agkistrodon halys pallas*）蛇毒纯化的凝血酶样酶也是缓慢降解人纤维蛋白原的β链（管利丰，1982）。我们纯化的组分Ⅰ和组分Ⅱ都能缓慢地降解人纤

维蛋白原的α链，而随着作用时间的延长组分Ⅰ还能进一步地部分降解人纤维蛋白原的β链，其作用机制值得进一步研究。

竹叶青凝血酶样酶组分Ⅰ能被丝氨酸蛋白酶的专一性抑制剂PMSF所抑制，所以组分Ⅰ是丝氨酸蛋白酶，其活性中心为丝氨酸残基，这与其它蛇毒中分离纯化的凝血酶样酶相似。另外过碘酸能强烈抑制组分Ⅰ的酶活性，因此组分Ⅰ糖基部分对酶活性是非常重要的，它可能与酶的识别和结合部位有关。

1970年 Toom 等曾报道金属离子 Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+} 对 *Agkistrodon contortrix laticinctus* 蛇毒中纯化的精氨酸酯酶有激活作用，其它所测定的金属离子没有抑制作用。我们的实验结果表明 Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+} 对组分Ⅰ和组分Ⅱ的精氨酸酯酶活性有明显的抑制作用，Co^{2+} 对组分Ⅱ的精氨酸酯酶活性有明显的抑制作用，其它所测定的金属离子无激活作用。这一结果与Toom的报道不同，我们认为主要原因可能与不同蛇毒中精氨酸酯酶性质不同有关，值得进一步研究。

竹叶青（*T. stejnegeri*）蛇毒中纯化的凝血酶样酶的研究，在国内外尚未见报道，我们对其纯化的凝血酶样酶作了较为系统的研究，证明它与烙铁头属中的棕点竹叶青（*T. gramineus* Ouyang, 1974）、黄绿烙铁头（*T. flavoviridis* Tiee Cherng SHIEH, 1985）蛇毒中的凝血酶样酶有许多相似性，如能凝固纤维蛋白原，具有精氨酸酯酶活性，是丝氨酸蛋白酶，无出血毒活性，无蛋白水解酶活性等。此外我们还发现从竹叶青蛇毒中纯化的凝血酶样酶分别具有激活纤溶和直接纤溶作用。同时证明竹叶青蛇毒中含有两个酶学性质不完全相同的凝血酶样酶，为竹叶青蛇毒的开发利用提供理论依据。

参考文献

王婉瑜等 1982 尖吻蝮蛇毒去纤酶制剂对家兔体内外凝血作用的影响。 动物学研究 3(2):145。

云南省动物研究所第四室 1976 我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定。生物化学与生物物理学报 8(2):151。

叶智彰等 1981 浙江产蝮蛇（*Agkistrodon halys pallas*）蛇毒纤溶组分对凝血系统的作用。 动物学研究 2(1):33。

管利丰、戚正武 1982 蝮蛇（*Agkistrodon halys pallas*）蛇毒类凝血酶的研究Ⅰ：分离纯化及理化、酶学性质的鉴定。 生物化学与生物物理学报 14(4):304。

Markland, F. S. *et al.* 1977 Thrombin-like enzyme from the venom of *Cratalus adamanteus*. *Thrombosis research* 10(3):487.

Omori, T. *et al.* 1964 The relationship between the hemorrhagic and lethal activities of *Japanese Mamushi* venom. *Toxicon* 2:1.

Pizzo, S.V. *et al.* 1972 Mechanism of Ancrod anticoagulation: A direct proteolytic effect on fibrin. *J. Clin. Inv.* 51:2841.

Toom, P. M. *et al.* 1970 Characterization of a nonproteolytic arginine ester-hydrolyzing enzyme from snake venom. *The. J. Biol. Chem.* 245(10):2549.

STUDIES ON ENZYMIC PROPERTIES OF THE THROMBIN-LIKE ENZYMES FROM *TRIMERESURUS STEJNEGERI* VENOM

Liu Niankun　Xiong Yuliang

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

In this paper, enzymic properties of two thrombin-like enzymes (principle I and principle II) was reported. The results showed that principle I and principle II could convert human fibrinogen into fibrin, both had arginine esterase activity and could hydrolyze Bz-Phe-Val-Arg-PNA which was special substrate of thrombin. Principle I and principle II had an activated fibrinolysis and principle II also had a direct fibrinolysis as showed by plate method of fibrin, principle I and principle II could slowly degrade the α chain of fibrinogen and principle I also could further degrade the β chain of fibrinogen. The active center of principle I is a serine protease and has a glycosyl site. The optimal temperature was 50°C and the optimal pH was 8.6 for principle I to hydrolyze BAEE.

Key words: Thrombin-like enzyme, Special substrate of thrombin, Active center, Degradation of fibrinogen